

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
18. März 2004 (18.03.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/022574 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07H 21/00 (72) Erfinder; und
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/009756 (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KRUPP, Guido
[DE/DE]; Rosenstr. 3, 24622 Gnutz (DE).
(22) Internationales Anmeldedatum: 2. September 2003 (02.09.2003) (74) Anwälte: MENGES VON, A. usw.; Uexküll & Stolberg,
Beselerstr. 4, 22607 Hamburg (DE).
(25) Einreichungssprache: Deutsch (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,
RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
(30) Angaben zur Priorität: 102 40 868.8 4. September 2002 (04.09.2002) DE (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
Hamburg (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: IMPROVED METHODS FOR THE SYNTHESIS OF NUCLEIC ACIDS

(54) Bezeichnung: VERBESSERTE VERFAHREN ZUR SYNTHESE VON NUKLEINSÄUREN

 Mn^{2+} (mM)

4 6 8 10

 Mg^{2+} (mM)

4 6 8 10



(57) Abstract: The invention relates to a method for the synthesis of nucleic acids, wherein a polymerase, a nucleic acid which can act as a matrix for the polymerase, NTPs and Mn^{2+} are incubated in certain conditions which enable the synthesis of a nucleic acid strand. Said method is characterised in that the conditions have a mol ratio of Mn^{2+} /NTP which is not greater than 0.7.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Veröffentlicht:

— *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts*

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Synthese von Nukleinsäuren, bei dem man eine Polymerase, eine Nukleinsäure, die als Matrice für die Polymerase dienen kann, NTPs und Mn^{2+} unter Bedingungen inkubiert, welche die Synthese eines Nukleinsäurestranges ermöglichen, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass die Bedingungen ein Molverhältnis von Mn^{2+} /NTP von nicht mehr als 0,7 umfassen.

Verbesserte Verfahren zur Synthese von Nukleinsäuren

Die vorliegende Erfindung betrifft verbesserte Verfahren zur Synthese von Nukleinsäuren, bei denen man eine Polymerase, eine Nukleinsäure, die als Matrize für die Polymerase dienen kann, NTPs und Mn^{2+} unter Bedingungen inkubiert, welche die Synthese eines Nukleinsäurestranges ermöglichen, wobei die Bedingungen dadurch gekennzeichnet sind, dass sie ein Molverhältnis von Mn^{2+} /NTP von nicht mehr als 0,7 umfassen.

Die Erfindung betrifft insbesondere Verfahren zur Herstellung von RNA, bei denen eine DNA als Matrize verwendet wird und eine Amplifikationsrate von mindestens 1000-fach erzielt wird. Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung Kits, die für die Durchführung der erfindungsgemäßen Verfahren notwendigen Bestandteile umfassen.

Die Vermehrung von Nukleinsäuren in vitro ist für eine Vielzahl molekularbiologischer Verfahren, beispielsweise für die Klonierung, Sequenzanalyse, in vitro Expression, etc. erforderlich. Dementsprechend sind Verfahren entwickelt worden, mittels derer

- 2 -

Nukleinsäuren in vitro synthetisch hergestellt werden können. Die Verfahren lassen sich dabei im Allgemeinen durch das Reaktionsprodukt, DNA oder RNA, unterscheiden.

- 5 Die in vitro Transkription ist ein Verfahren zur Synthese von RNA üblicherweise ausgehend von einer doppelsträngigen DNA-Matrize. Dabei werden isolierte Bestandteile der zellulären Transkription (RNA-Polymerase und NTPs) für eine enzymatische Reaktion im Reagenzglas genutzt. Man geht dabei davon aus, dass das Substrat
10 für die Synthesereaktion ein Komplex aus Mg^{2+} und NTP ist. Mg^{2+} ist somit ein wichtiger Bestandteil der Reaktion und wird üblicherweise im Vergleich zu der NTP-Konzentration in einem Überschuß zugegeben (Milligan und Uhlenbeck, Methods in Enzymology, Vol. 180 (1989), 51-62; und Wyatt et al., Biotechniques,
15 Voll. 11 (1991), 764-769).

Zur Optimierung der Amplifikationsrate bei der in vitro Transkription schlägt die US 5,256,555 beispielsweise vor, die Nukleotide in einer Konzentration von insgesamt mehr als 16 mM
20 in die Reaktion einzusetzen. Gleichzeitig soll das für die Reaktion notwendige Mg^{2+} in einer Konzentration eingesetzt werden, die nicht mehr als 10 % oberhalb der Konzentration der Summe aller Nukleotide beträgt. Ferner soll anorganische Pyrophosphatase in der Reaktionsmischung vorliegen.

25

Das bekannteste Verfahren zur Synthese von DNA ist die Polymerase-Ketten-Reaktion ("polymerase chain reaction" oder PCR), welche Mitte der 80er Jahre von Kary Mullis entwickelt wurde (vgl. Saiki et al., Science, Vol. 230 (1985), 1350-1354; und EP 201 184).

30

Bei der PCR-Reaktion lagern sich Einzelstrang-Primer (Oligonukleotide mit einer Kettenlänge von üblicherweise 12 bis 24 Nukleotiden) an eine komplementäre, einzelsträngige DNA-Sequenz an. Die Primer werden mittels einer DNA-Polymerase und den
35 Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs, nämlich dATP, dCTP, dGTP, dTTP) zu einem Doppelstrang verlängert. Der Doppelstrang wird durch Hitzeeinwirkung in Einzelstränge aufgetrennt. Die

- 3 -

Temperatur wird so weit gesenkt, dass sich erneut Einzelstrang-Primer an die DNA-Einzelstränge anlagern. Die Primer werden durch die DNA-Polymerase erneut zu einem Zweitstrang elongiert.

- 5 Bei Wiederholung der obigen Schritte ist eine exponentielle Vermehrung der Ausgangs-DNA-Stränge möglich, da die Reaktionsbedingungen so gewählt werden können, dass aus nahezu jedem DNA-Einzelstrang bei jedem Reaktionsdurchlauf ein Doppelstrang gebildet wird, der nachfolgend wieder in zwei Einzelstränge
10 aufgespalten wird, welche wiederum als Matrize für weitere Stränge dienen.

- Sofern vor diesem Verfahren eine reverse Transkription durchgeführt wird, bei der mittels einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase
15 ein DNA-Einzelstrang (die sogenannte cDNA) aus einer mRNA gebildet wird, kann die PCR-Reaktion auch unmittelbar auf die Vermehrung von Nukleinsäuren ausgehend von einer RNA-Sequenz anwendbar (vgl. EP 201 184).

- 20 Zu den genannten Reaktions-Grundschemata wurden eine Vielzahl von Alternativen entwickelt, die sich in Abhängigkeit des Ausgangsmaterials (RNA, DNA, Einzelstränge, Doppelstränge) und des Reaktionsproduktes (Vermehrung spezifischer RNA- oder DNA-Sequenzen in einer Probe oder Vermehrung aller Sequenzen)
25 voneinander unterscheiden.

- Die DE 101 43 106.6 und DE 102 24 200.3 beschreiben beide Verfahren zur Vermehrung von Ribonukleinsäuren, welche eine Kombination aus einzelnen Schritten der PCR-Reaktion und einer
30 Transkription umfassen.

- Trotz der beschriebenen Fortschritte besteht nach wie vor ein Bedürfnis an verbesserten Verfahren zur Synthese von Nukleinsäuren, insbesondere an Verfahren, die eine hohe Syntheseleistung
35 und -ausbeute bei einem geringen Verbrauch der Chemikalien ermöglichen.

- 4 -

Diese Aufgabe wurde nunmehr durch Verfahren zur Synthese von Nukleinsäuren gelöst, bei denen man eine Polymerase, eine Nukleinsäure, die als Matrize für die Polymerase dienen kann, NTPs und Mn^{2+} unter Bedingungen inkubiert, welche die Synthese
5 eines Nukleinsäurestranges ermöglichen, wobei die Bedingungen dadurch gekennzeichnet sind, dass diese ein Molverhältnis von Mn^{2+} /NTP von nicht mehr als 0,7 umfassen.

Erfindungsgemäß wurde somit überraschenderweise festgestellt,
10 dass eine deutlich verbesserte Syntheserate der Polymerase bereits durch die Auswahl des genannten Molverhältnisses von Mn^{2+} /NTP erzielt werden kann. Gleichzeitig werden durch die geringere Konzentration der einzusetzenden NTPs Kosten gespart. Eine hohe Amplifikationsrate läßt sich somit auf einfache und
15 kostengünstige Art und Weise erzielen.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird der Begriff "Molverhältnis Mn^{2+} /NTP" verwendet, um den Quotienten der molaren Konzentration des Mn^{2+} im Verhältnis zur molaren Konzentration aller
20 NTPs als Zahl darzustellen.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren werden die Bedingungen für die Synthese des Nukleinsäurestranges so gewählt, dass das Molverhältnis von
25 Mn^{2+} /NTP von 0,2 bis 0,6, vorzugsweise von 0,3 bis 0,5 beträgt.

Bei Verwendung der erfindungsgemäßen Molverhältnisse beträgt die Gesamtkonzentration der NTPs vorzugsweise 4 bis 24mM; bei Verwendung vier verschiedener NTPs somit je 1 bis 6mM.

30 Daraus ergibt sich für Mn^{2+} ein bevorzugter Konzentrationsbereich von 0,8 mM (Molverhältnis von 0,2 bei Konzentration der NTPs von 4mM) bis 14,4 mM (Molverhältnis von 0,6 bei Konzentration der NTPs von 24mM) .

35 Als Polymerase kann in den erfindungsgemäßen Verfahren eine beliebige Polymerase eingesetzt werden, wobei die Verwendung von

- 5 -

RNA-Polymerasen, insbesondere von DNA-abhängigen RNA-Polymerase, welche für die Synthese von RNA eine DNA als Matrize benötigen, die einen Promotor enthält, für alle Ausführungsformen der Erfindung besonders bevorzugt ist. Es kann sich somit beispielsweise um eine T7 RNA-Polymerase, eine T3 RNA-Polymerase, oder eine SP6 RNA-Polymerase handeln.

Bei der RNA-Polymerase kann es sich um eine RNA-abhängige oder eine DNA-abhängige Polymerase handeln. Die meisten der natürlicherweise DNA-abhängigen RNA-Polymerasen können auch RNA als Matrize erkennen, wenn eine geeignete Struktur vorliegt (vgl. Konarska, M.M. und Sharp, P.A., Cell Vol. 57 (1989), 423-431; und Konarska, M.M. und Sharp, P.A., Cell Vol. 63 (1990), 609-618).

Die Polymerase und die Nukleinsäure, die als Matrize dient, müssen zueinander passen. Die Nukleinsäure, die als Matrize für eine RNA-Polymerase dienen kann, muss beispielsweise Erkennungssequenzen oder Erkennungsstrukturen aufweisen, welche der RNA-Polymerase den Synthesestart ermöglichen. Vorzugsweise wird DNA als Matrize für die RNA-Polymerase eingesetzt. Entsprechende DNA kann eine Promotorregion enthalten, welche von der RNA-Polymerase erkannt und für den Synthesestart genutzt werden kann. Alternativ dazu kann die DNA eine Erkennungsstruktur ausbilden, welche es der RNA-Polymerase ermöglicht, die Synthese zu initiieren. Entsprechende Erkennungsstrukturen werden beispielsweise in Krupp (Nucleic Acids Res. Vol. 17 (1989), 3023-3036) und in Kuhn et al. (Nature Vol. 344 (1990), 559-562) beschrieben.

Da die erfindungsgemäßen Verfahren eine besonders hohe Amplifikationsrate ermöglichen, kann die Nukleinsäure, die als Matrize für die Polymerase eingesetzt wird, in sehr geringer Konzentration vorliegen. Die Matrize kann beispielsweise in Form von DNA oder mRNA in einer Menge von mindestens 0,1 picogramm, bzw. 0,2 attomol in einem Ansatz von 20 µl, somit einer Konzentration von mindestens 10 femtomolar eingesetzt werden.

Der Reaktionsansatz muss NTPs enthalten, wobei bei Verwendung einer RNA-Polymerase üblicherweise ATP, UTP, CTP und GTP eingesetzt werden. Bei einer im Stand der Technik üblichen Transkription werden alle hier genannten NTPs in einem Reaktions-
5 ansatz eingesetzt. Es kann jedoch auch wünschenswert oder vorteilhaft sein, lediglich eines oder einige der NTPs einzusetzen.

Alternativ oder zusätzlich zu den NTPs können bei Durchführung
10 des erfindungsgemäßen Verfahrens unter Verwendung der RNA- oder DNA-Polymerase ferner dNTPs eingesetzt werden. Dieses Vorgehen weist den besonderen Vorteil auf, dass das Transkript vollständig oder teilweise DNA-Eigenschaften erhält, d.h. es wird Nuklease-resistent und bietet eine bessere Matrize für die RNA-Polymerase.
15 Als dNTPs werden üblicherweise dATP, dTTP, dCTP und/oder dGTP eingesetzt.

Alle oder einige der NTPs und/oder der dNTPs können als modifizierte Verbindung oder Derivate vorliegen. Im Stand der Technik
20 übliche Derivatisierungen umfassen die Kopplung von Biotin oder eines Fluoreszenzmarkers, welche beispielsweise den Nachweis der Syntheseprodukte vereinfachen können.

Die Reaktionszeit und weiteren Reaktionsbedingungen (Temperatur, pH-Wert, etc.) können vom Fachmann in Abhängigkeit der verwendeten Polymerase und der zu erzielenden Amplifikationsrate
25 einfach gewählt werden. Die Inkubationszeit kann beispielsweise von 1 bis 24 Stunden, vorzugsweise von 4 bis 16 Stunden betragen. Bei Verwendung der T7-RNA-Polymerase bietet es sich an, die
30 Reaktion in dem Bereich von 30°C bis 45°C durchzuführen.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht eine überraschende Verbesserung der Amplifikationsrate. Im Rahmen der vorliegenden Anmeldung wird das Verhältnis der Menge synthetisch hergestellter
35 Nukleinsäuren zu der Menge der ursprünglich vorliegenden Matrize als Amplifikationsrate bezeichnet. Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht eine Amplifikationsrate von mindestens 1000, vor-

- 7 -

zugsweise mindestens 2000. Bei optimalen Reaktionsbedingungen wurde sogar eine Amplifikationsrate von 2500 erzielt.

Die erfindungsgemäßen Verfahren können für eine Vielzahl von
5 Zwecken zum Einsatz gelangen. Die verbesserten Verfahren zur Herstellung von Nukleinsäuren können beispielsweise in den in DE 101 43 106.6 und DE 102 24 200.3 beschriebenen Verfahren zur Vermehrung von Ribonukleinsäuren eingesetzt werden. Die mittels der erfindungsgemäßen Verfahren erhaltenen Nukleinsäuren können
10 als Sonden an einen Chip gebunden werden. Die Verfahren können für die *in vitro* Transkription, für die Untersuchung von Wechselwirkungen mit Nukleinsäurebindungsfaktoren, als Aptamere zur spezifischen Bindung von Molekülen, als Ribozyme, etc. eingesetzt werden.

15

Die vorliegende Erfindung betrifft schließlich Kits zur Synthese von Nukleinsäuren, die in einem oder mehreren Behältern eine Polymerase, NTPs, dNTPs und/oder deren Derivate (beispielsweise biotinylierte oder mit Fluoreszenzmarkern gekoppelte NTPs oder
20 dNTPs) und Mn^{2+} umfassen. Bei der Polymerase handelt es sich vorzugsweise um eine DNA-abhängige RNA-Polymerase, welche für die Synthese von RNA eine DNA als Matrize benötigt, die einen Promotor enthält. Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der RNA-Polymerase um die T7 RNA-
25 Polymerase, T3 RNA-Polymerase, oder SP6 RNA-Polymerase.

Entsprechende Kits enthalten ferner vorzugsweise eine Anweisung zur Durchführung eines der erfindungsgemäßen Verfahren. In entsprechenden Anweisungen oder Handbüchern wird genau beschrie-
30 ben, in welcher Menge die einzelnen Bestandteile der Reaktion miteinander vermischt werden müssen, um optimale Syntheseleistungen zu erhalten.

35

Kurze Beschreibung der Figuren

- Fig. 1 In vitro Transkription unter Verwendung verschiedener Konzentrationen von Mn^{2+} und Mg^{2+} ; Bestimmung des optimalen Verhältnisses Mn^{2+} /NTPs und Vergleich mit Mg^{2+} .
- Fig. 2 Bestimmung der optimalen NTP-Konzentration bei verschiedenen Mn /NTP-Verhältnissen.
- Fig. 3 Bestimmung der Amplifikationsrate

Beispiel 1

15

In diesem Beispiel wurde die Transkriptionsleistung der RNA-Polymerase in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen von Mn^{2+} sowie Mg^{2+} ermittelt.

20

Dafür wurde in einem Reaktionsansatz 20 μ l, 40 mM Tris-HCl (pH 8), 10 mM DTT, 2 mM Spermidin, 0,01% Triton X-100, 10 ng Nukleinsäure Matrize (Plasmid pTRI-Xef), 10 U RNasin-(RNase-Inhibitor), 40 U T7 RNA-Polymerase, 4 mM NTPs (jedes; ergibt gesamt 16 mM) und Mn^{2+} oder Mg^{2+} in einer Konzentration von 4 mM bis 10 mM zusammen pipettiert und für 16 Stunden inkubiert.

25

Aliquote Teilmengen von 5 μ l wurden auf einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und nach Anfärbung mit Ethidiumbromid photographiert. Das Ergebnis ist in Fig. 1 dargestellt.

30

In Abhängigkeit der Konzentration des Mn^{2+} oder Mg^{2+} ergibt sich ein Verhältnis aus Mn^{2+} /NTPs von 0,25 bis 0,625.

35

Fig. 1 zeigt eindeutig, dass die Gegenwart von Mn^{2+} im Vergleich zu der Gegenwart von Mg^{2+} in allen Versuchsansätzen eine bessere Amplifikationsrate erzielte.

- 9 -

Beispiel 2

Das Ziel dieses Beispiels bestand darin, die optimale NTP-Konzentration in Abhängigkeit des Mn/NTP-Verhältnisses zu
5 ermitteln.

Zu diesem Zweck wurden Reihen von Versuchsansätzen für die in vitro-Transkription wie in Beispiel 1 erstellt. Die Konzentration der einzelnen NTPs betrug dabei von 2 mM bis 10 mM und die
10 Konzentration des MnCl_2 betrug von 2,4 mM bis 24 mM. Daraus ergeben sich Verhältnisse von Mn/NTP von 0,3 bis 0,6.

Die durch die Transkription erhaltene Menge an Transkript (in ng) wurde durch Ethidiumbromidfärbung des Gels und einer RNA-
15 Verdünnungsreihe als Standard im Gel bestimmt.

Das Ergebnis ist in Fig. 2 zusammengefasst und zeigt, daß bereits bei einer Konzentration von 4mM je NTP (gesamt also 16mM) eine maximale Syntheserate erbrachten. Die besten Ergebnisse wurden
20 bei der Kombination von 4 mM je NTP und 6,4 mM MnCl_2 erhalten (entspricht einem Verhältnis von 0,4).

Beispiel 3

25 In diesem Beispiel wurde die Amplifikationsrate der in vitro-Transkription in Abhängigkeit der Zeit bestimmt. Dafür wurde zunächst eine in vitro-Transkriptionsreaktion wie in Beispiel 1 beschrieben erstellt, wobei 4,8 mM MnCl_2 und 4 mM NTP (Summe
30 16 mM) eingesetzt wurden (entspricht einem Verhältnis von 0,3).

Zu den in Fig. 3 genannten Zeiten wurden je 5 μl entnommen und auf einem 1 % nativen Agarosegel analysiert. Die Ergebnisse werden in Fig. 3 gezeigt und lassen erkennen, dass in allen
35 Reaktionsansätzen ein Amplifikationsfaktor von mehr als 1500 erzielt wurde.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Synthese von Nukleinsäuren, bei dem man eine Polymerase, eine Nukleinsäure, die als Matrize für die Polymerase dienen kann, NTPs und Mn^{2+} unter Bedingungen inkubiert, welche die Synthese eines Nukleinsäurestranges ermöglichen, dadurch gekennzeichnet, dass die Bedingungen ein Molverhältnis von Mn^{2+} /NTP von nicht mehr als 0,7 umfassen.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Polymerase eine RNA-Polymerase ist, vorzugsweise eine DNA-abhängige RNA-Polymerase, welche für die Synthese von RNA eine DNA als Matrize benötigen, die einen Promotor enthält.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Molverhältnis von Mn^{2+} /NTP von 0,2 bis 0,6 beträgt, vorzugsweise 0,3 bis 0,5.
4. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Gesamtkonzentration der NTPs 4 bis 24mM beträgt.
5. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration des Mn^{2+} mindestens 3mM, vorzugsweise mindestens 3,5mM oder mindestens 4mM beträgt.
6. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, bei dem die Konzentration des Mn^{2+} von 4 bis 17 mM beträgt.
7. Verfahren gemäß irgendeinem der Ansprüche 1 bis 6, bei dem man als Polymerase eine T7 RNA-Polymerase, eine T3 RNA-Polymerase, oder eine SP6 RNA-Polymerase einsetzt.

- 11 -

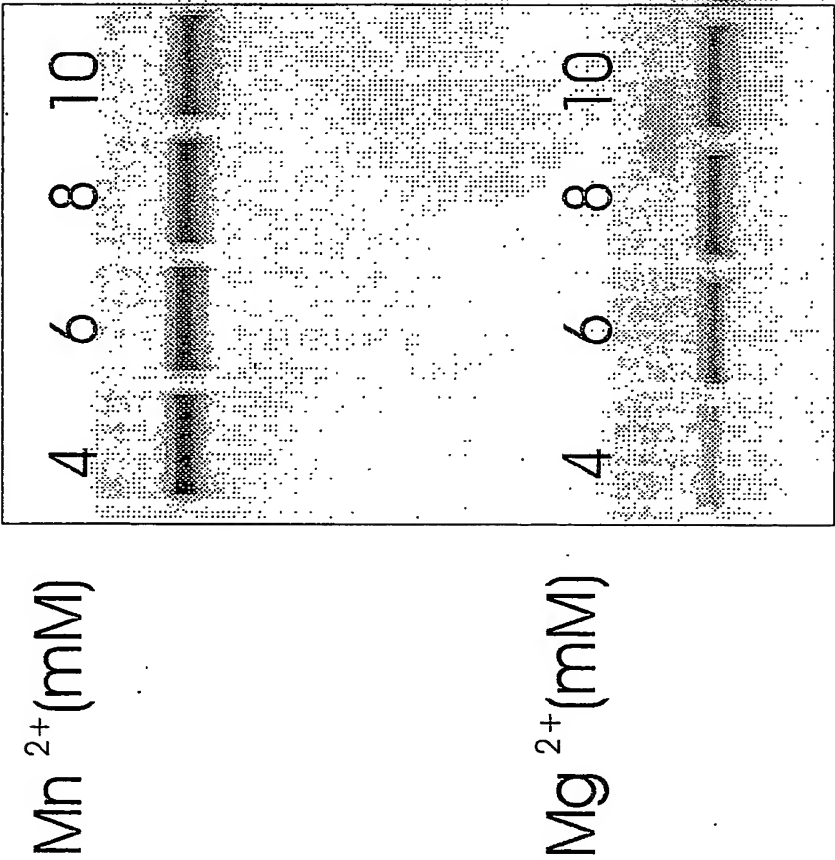
8. Verfahren gemäß irgendeinem der vorstehenden Ansprüche, bei dem man als Nukleinsäure, die als Matrize für die RNA-Polymerase dienen kann, DNA oder RNA einsetzt.
9. Verfahren gemäß irgendeinem der vorstehenden Ansprüche, bei dem die Nukleinsäure, die als Matrize für die RNA-Polymerase dienen kann, RNA oder DNA in einer Menge von mindestens 0,1 picogramm (bzw. 0,2 attomol) oder einer Konzentration von mindestens 10 femtomolar vorliegt.
10. Verfahren gemäß irgendeinem der vorstehenden Ansprüche, bei dem ATP, UTP, CTP und/oder GTP als NTPs eingesetzt werden.
11. Verfahren gemäß irgendeinem der vorstehenden Ansprüche, bei dem ferner dNTPs eingesetzt werden.
12. Verfahren gemäß irgendeinem der vorstehenden Ansprüche, bei dem dATP, dTTP, dCTP und/oder dGTP als dNTPs eingesetzt werden.
13. Verfahren gemäß irgendeinem der vorstehenden Ansprüche, bei dem die NTPs oder dNTPs als Derivate, beispielsweise als biotinylierte oder mit einem Fluoreszenzmarker-gekoppelte Derivate, eingesetzt werden.
14. Verfahren gemäß irgendeinem der vorstehenden Ansprüche, bei dem eine Amplifikationsrate von mindestens 1000-fach, vorzugsweise mindestens 2000-fach, erzielt wird.
15. Kit zur Synthese von Nukleinsäuren, das in einem Behälter oder in mehreren getrennten Behältern eine Polymerase, NTPs und Mn^{2+} umfasst.
16. Kit gemäß Anspruch 15, in dem die RNA-Polymerase eine DNA-abhängige RNA-Polymerase ist, welche für die Synthese von RNA eine DNA als Matrize benötigt, die einen Promotor enthält, wobei es sich vorzugsweise bei der RNA-Polymerase

- 12 -

um die T7 RNA-Polymerase, T3 RNA-Polymerase, oder SP6 RNA-Polymerase handelt.

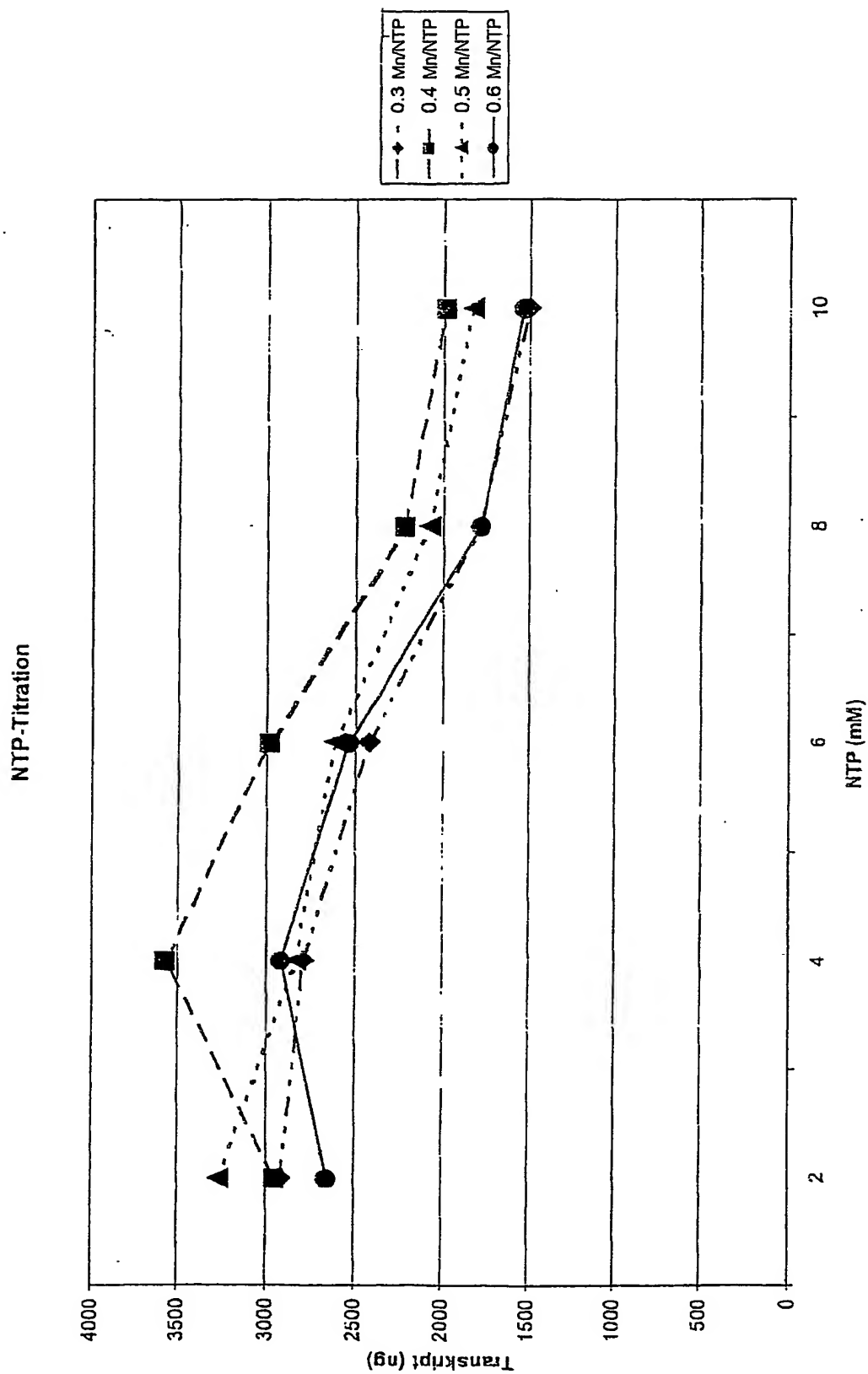
17. Kit gemäß Anspruch 15 oder 16, in dem ATP, UTP, CTP und/oder GTP als NTPs vorliegen.
18. Kit gemäß einem der Ansprüche 15 bis 17, in dem ferner dNTPs vorliegen.
19. Kit gemäß einem der Ansprüche 15 bis 18, in dem dATP, dTTP, dCTP und/oder dGTP als dNTPs vorliegen.
20. Kit gemäß einem der Ansprüche 15 bis 19, in dem die NTPs oder dNTPs als Derivate, beispielsweise als biotinylierte oder mit einem Fluoreszenzmarker-gekoppelte Derivate, vorliegen.
21. Kit gemäß einem der Ansprüche 15 bis 20, das ferner eine Anweisung zur Durchführung eines Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14 umfasst.

Figur 1



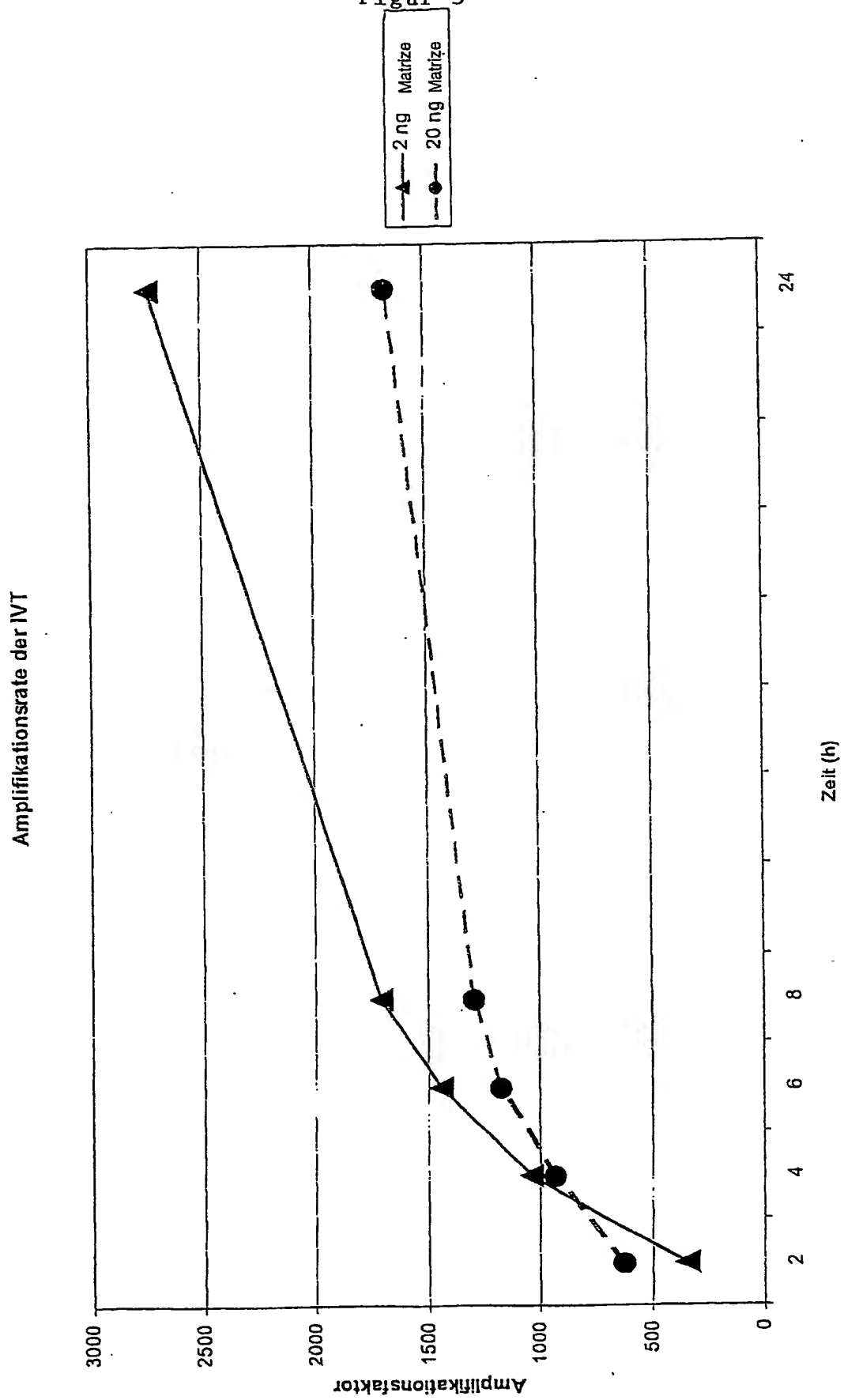
2/3

Figur 2



3/3

Figur 3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/B 3/09756

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WO 92 08800 A (SISKA DIAGNOSTICS INC) 29 May 1992 (1992-05-29) page 36, line 31 -page 39, line 4 page 46, line 17 - line 32 example 6 claims 9,10,28,29,57,58</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	1-4,7-21

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the International filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 December 2003

Date of mailing of the International search report

04/03/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ulbrecht, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/E /09756

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>PEZO V ET AL: "Hypermutagenic in vitro transcription employing biased NTP pools and manganese cations"</p> <p>GENE: AN INTERNATIONAL JOURNAL ON GENES AND GENOMES, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, BARKING, GB, vol. 186, no. 1, 20 February 1997 (1997-02-20), pages 67-72, XP004054881 ISSN: 0378-1119 page 68, left-hand column, paragraph 1 figure 1 table 1</p>	1-4, 7-21
X	<p>US 6 090 589 A (EKENBERG STEVEN J ET AL) 18 July 2000 (2000-07-18)</p> <p>example 13</p>	1-4, 8-10, 13-17, 20, 21
X	<p>US 5 407 800 A (GELFAND DAVID H ET AL) 18 April 1995 (1995-04-18)</p> <p>column 15, line 17 - line 35 column 17, line 50 - line 68</p>	1, 3, 8, 9, 11-15, 18-21
X	<p>US 5 561 058 A (SIGUA CHRISTOPHER L ET AL) 1 October 1996 (1996-10-01)</p> <p>column 14, line 17 - line 34 column 21, line 34 - column 22, line 11 column 27, line 1 - line 3 example 14</p>	1, 3, 8, 9, 11-15, 18-21
A	<p>G. LÖFFLER AND P.E. PETRIDES: "Biochemie und Pathobiochemie" 1998, SPRINGER, BERLIN HEIDELBERG NEW YORK XP002263485 v.a.: S.150, Sp.1 und Abb. 7.1 page 150 -page 154</p>	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP/09756

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9208800	A	29-05-1992	AU 9131591 A	11-06-1992
			CA 2096013 A1	14-05-1992
			EP 0572417 A1	08-12-1993
			FI 932144 A	12-05-1993
			HU 69772 A2	28-09-1995
			IE 913930 A1	17-06-1992
			IL 100040 A	31-12-1995
			JP 6502767 T	31-03-1994
			NO 931709 A	12-07-1993
			NZ 240574 A	26-10-1994
			PT 99500 A	30-10-1992
			WO 9208800 A1	29-05-1992
			ZA 9108965 A	26-08-1992
US 6090589	A	18-07-2000	US 2002192677 A1	19-12-2002
			US 6369207 B1	09-04-2002
			AT 159763 T	15-11-1997
			AU 694199 B2	16-07-1998
			AU 2022295 A	21-09-1995
			AU 8935798 A	07-01-1999
			AU 9165091 A	17-08-1992
			CA 2076750 A1	01-07-1992
			DE 69128077 D1	04-12-1997
			DE 69128077 T2	26-02-1998
			DK 519053 T3	20-07-1998
			EP 0519053 A1	23-12-1992
			ES 2108748 T3	01-01-1998
			JP 5505111 T	05-08-1993
			JP 3183510 B2	09-07-2001
			KR 231383 B1	15-11-1999
			WO 9212261 A1	23-07-1992
US 5407800	A	18-04-1995	US 5322770 A	21-06-1994
			US 4889818 A	26-12-1989
			AT 151112 T	15-04-1997
			AU 656315 B2	02-02-1995
			AU 7244491 A	24-07-1991
			CA 2071213 A1	23-06-1991
			DE 69030386 D1	07-05-1997
			DE 69030386 T2	09-10-1997
			DK 506889 T3	22-09-1997
			EP 0506889 A1	07-10-1992
			ES 2100945 T3	01-07-1997
			GR 3023862 T3	30-09-1997
			JP 2968585 B2	25-10-1999
			JP 5505105 T	05-08-1993
			US 5310652 A	10-05-1994
			WO 9109944 A2	11-07-1991
			US 5618703 A	08-04-1997
			US 5641864 A	24-06-1997
			US 5693517 A	02-12-1997
			US 5561058 A	01-10-1996
			US 5795762 A	18-08-1998
			US 5466591 A	14-11-1995
			AT 169337 T	15-08-1998
			AU 681387 B2	28-08-1997
			AU 6329694 A	01-09-1994
			AU 646430 B2	24-02-1994

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/09756

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5407800	A		AU 7176491 A	24-07-1991
			CA 2071196 A1	23-06-1991
			DE 69032543 D1	10-09-1998
			DE 69032543 T2	15-04-1999
			DK 506825 T3	03-05-1999
			EP 0506825 A1	07-10-1992
			ES 2121777 T3	16-12-1998
			JP 2790448 B2	27-08-1998
			JP 9224682 A	02-09-1997
			JP 2774192 B2	09-07-1998
			JP 5504887 T	29-07-1993
			SG 46627 A1	20-02-1998
			WO 9109950 A1	11-07-1991
			US 5618711 A	08-04-1997
			US 5789224 A	04-08-1998
			AT 135741 T	15-04-1996
			AU 3062989 A	11-08-1989
			AU 632857 B2	14-01-1993
			AU 6391090 A	10-01-1991
			DE 68926038 D1	25-04-1996
			DE 68926038 T2	17-10-1996
			DE 395736 T1	03-09-1992
			EP 0395736 A1	07-11-1990
			HK 166096 A	13-09-1996
US 5561058	A	01-10-1996	US 5693517 A	02-12-1997
			US 5310652 A	10-05-1994
			US 5418149 A	23-05-1995
			US 5322770 A	21-06-1994
			US 4889818 A	26-12-1989
			AT 205259 T	15-09-2001
			AU 675318 B2	30-01-1997
			AU 6594694 A	12-01-1995
			CA 2127188 A1	02-01-1995
			DE 69428167 D1	11-10-2001
			DE 69428167 T2	29-05-2002
			DK 632134 T3	03-12-2001
			EP 0632134 A2	04-01-1995
			ES 2161731 T3	16-12-2001
			JP 3097893 B2	10-10-2000
			JP 7059599 A	07-03-1995
			US 5618703 A	08-04-1997
			US 5641864 A	24-06-1997
			US 5618711 A	08-04-1997
			US 5789224 A	04-08-1998
			AT 176002 T	15-02-1999
			AU 665338 B2	04-01-1996
			AU 8532791 A	18-02-1992
			CA 2087724 A1	25-01-1992
			DE 69130800 D1	04-03-1999
			DE 69130800 T2	16-09-1999
			DK 540693 T3	13-09-1999
			EP 0540693 A1	12-05-1993
			ES 2128323 T3	16-05-1999
			GR 3029987 T3	30-07-1999
			JP 3392863 B2	31-03-2003
			JP 6501612 T	24-02-1994
			WO 9201814 A2	06-02-1992

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/E08/09756

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5561058	A	US 5795762 A	18-08-1998
		US 5466591 A	14-11-1995
		AT 151112 T	15-04-1997
		AU 656315 B2	02-02-1995
		AU 7244491 A	24-07-1991
		CA 2071213 A1	23-06-1991
		DE 69030386 D1	07-05-1997
		DE 69030386 T2	09-10-1997
		DK 506889 T3	22-09-1997
		EP 0506889 A1	07-10-1992
		ES 2100945 T3	01-07-1997
		GR 3023862 T3	30-09-1997
		JP 2968585 B2	25-10-1999
		JP 5505105 T	05-08-1993
		US 5407800 A	18-04-1995
		WO 9109944 A2	11-07-1991
		AT 169337 T	15-08-1998

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 92 08800 A (SISKA DIAGNOSTICS INC) 29. Mai 1992 (1992-05-29) Seite 36, Zeile 31 - Seite 39, Zeile 4 Seite 46, Zeile 17 - Zeile 32 Beispiel 6 Ansprüche 9,10,28,29,57,58 --- -/--	1-4,7-21

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

2. Dezember 2003

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

04/03/2004

 Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Ulbrecht, M

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>PEZO V ET AL: "Hypermutagenic in vitro transcription employing biased NTP pools and manganese cations"</p> <p>GENE: AN INTERNATIONAL JOURNAL ON GENES AND GENOMES, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, BARKING, GB, Bd. 186, Nr. 1, 20. Februar 1997 (1997-02-20), Seiten 67-72, XP004054881 ISSN: 0378-1119 Seite 68, linke Spalte, Absatz 1 Abbildung 1 Tabelle 1</p>	1-4,7-21
X	<p>US 6 090 589 A (EKENBERG STEVEN J ET AL) 18. Juli 2000 (2000-07-18)</p> <p>Beispiel 13</p>	1-4, 8-10, 13-17, 20,21
X	<p>US 5 407 800 A (GELFAND DAVID H ET AL) 18. April 1995 (1995-04-18)</p> <p>Spalte 15, Zeile 17 - Zeile 35 Spalte 17, Zeile 50 - Zeile 68</p>	1,3,8,9, 11-15, 18-21
X	<p>US 5 561 058 A (SIGUA CHRISTOPHER L ET AL) 1. Oktober 1996 (1996-10-01)</p> <p>Spalte 14, Zeile 17 - Zeile 34 Spalte 21, Zeile 34 - Spalte 22, Zeile 11 Spalte 27, Zeile 1 - Zeile 3 Beispiel 14</p>	1,3,8,9, 11-15, 18-21
A	<p>G. LÖFFLER AND P.E. PETRIDES: "Biochemie und Pathobiochemie" 1998, SPRINGER, BERLIN HEIDELBERG NEW YORK XP002263485 v.a.: S.150, Sp.1 und Abb. 7.1 Seite 150 -Seite 154</p>	1-21

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zu einer Patentfamilie gehören

Internationale Aktenzeichen

PCT/EP 09756

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9208800	A	29-05-1992	AU 9131591 A 11-06-1992
		CA 2096013 A1 14-05-1992	
		EP 0572417 A1 08-12-1993	
		FI 932144 A 12-05-1993	
		HU 69772 A2 28-09-1995	
		IE 913930 A1 17-06-1992	
		IL 100040 A 31-12-1995	
		JP 6502767 T 31-03-1994	
		NO 931709 A 12-07-1993	
		NZ 240574 A 26-10-1994	
		PT 99500 A 30-10-1992	
		WO 9208800 A1 29-05-1992	
		ZA 9108965 A 26-08-1992	
US 6090589	A	18-07-2000	US 2002192677 A1 19-12-2002
		US 6369207 B1 09-04-2002	
		AT 159763 T 15-11-1997	
		AU 694199 B2 16-07-1998	
		AU 2022295 A 21-09-1995	
		AU 8935798 A 07-01-1999	
		AU 9165091 A 17-08-1992	
		CA 2076750 A1 01-07-1992	
		DE 69128077 D1 04-12-1997	
		DE 69128077 T2 26-02-1998	
		DK 519053 T3 20-07-1998	
		EP 0519053 A1 23-12-1992	
		ES 2108748 T3 01-01-1998	
		JP 5505111 T 05-08-1993	
		JP 3183510 B2 09-07-2001	
		KR 231383 B1 15-11-1999	
		WO 9212261 A1 23-07-1992	
US 5407800	A	18-04-1995	US 5322770 A 21-06-1994
		US 4889818 A 26-12-1989	
		AT 151112 T 15-04-1997	
		AU 656315 B2 02-02-1995	
		AU 7244491 A 24-07-1991	
		CA 2071213 A1 23-06-1991	
		DE 69030386 D1 07-05-1997	
		DE 69030386 T2 09-10-1997	
		DK 506889 T3 22-09-1997	
		EP 0506889 A1 07-10-1992	
		ES 2100945 T3 01-07-1997	
		GR 3023862 T3 30-09-1997	
		JP 2968585 B2 25-10-1999	
		JP 5505105 T 05-08-1993	
		US 5310652 A 10-05-1994	
		WO 9109944 A2 11-07-1991	
		US 5618703 A 08-04-1997	
		US 5641864 A 24-06-1997	
		US 5693517 A 02-12-1997	
		US 5561058 A 01-10-1996	
		US 5795762 A 18-08-1998	
		US 5466591 A 14-11-1995	
		AT 169337 T 15-08-1998	
		AU 681387 B2 28-08-1997	
		AU 6329694 A 01-09-1994	
		AU 646430 B2 24-02-1994	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zu einer Patentfamilie gehören

Internationales Abkürzungen

PCT/EP/09756

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5407800 A		AU 7176491 A	24-07-1991
		CA 2071196 A1	23-06-1991
		DE 69032543 D1	10-09-1998
		DE 69032543 T2	15-04-1999
		DK 506825 T3	03-05-1999
		EP 0506825 A1	07-10-1992
		ES 2121777 T3	16-12-1998
		JP 2790448 B2	27-08-1998
		JP 9224682 A	02-09-1997
		JP 2774192 B2	09-07-1998
		JP 5504887 T	29-07-1993
		SG 46627 A1	20-02-1998
		WO 9109950 A1	11-07-1991
		US 5618711 A	08-04-1997
		US 5789224 A	04-08-1998
		AT 135741 T	15-04-1996
		AU 3062989 A	11-08-1989
		AU 632857 B2	14-01-1993
		AU 6391090 A	10-01-1991
		DE 68926038 D1	25-04-1996
		DE 68926038 T2	17-10-1996
		DE 395736 T1	03-09-1992
		EP 0395736 A1	07-11-1990
		HK 166096 A	13-09-1996
US 5561058 A	01-10-1996	US 5693517 A	02-12-1997
		US 5310652 A	10-05-1994
		US 5418149 A	23-05-1995
		US 5322770 A	21-06-1994
		US 4889818 A	26-12-1989
		AT 205259 T	15-09-2001
		AU 675318 B2	30-01-1997
		AU 6594694 A	12-01-1995
		CA 2127188 A1	02-01-1995
		DE 69428167 D1	11-10-2001
		DE 69428167 T2	29-05-2002
		DK 632134 T3	03-12-2001
		EP 0632134 A2	04-01-1995
		ES 2161731 T3	16-12-2001
		JP 3097893 B2	10-10-2000
		JP 7059599 A	07-03-1995
		US 5618703 A	08-04-1997
		US 5641864 A	24-06-1997
		US 5618711 A	08-04-1997
		US 5789224 A	04-08-1998
		AT 176002 T	15-02-1999
		AU 665338 B2	04-01-1996
		AU 8532791 A	18-02-1992
		CA 2087724 A1	25-01-1992
		DE 69130800 D1	04-03-1999
		DE 69130800 T2	16-09-1999
		DK 540693 T3	13-09-1999
		EP 0540693 A1	12-05-1993
		ES 2128323 T3	16-05-1999
		GR 3029987 T3	30-07-1999
		JP 3392863 B2	31-03-2003
		JP 6501612 T	24-02-1994
		WO 9201814 A2	06-02-1992

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die der selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/E/ /09756

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5561058 A		US 5795762 A	18-08-1998
		US 5466591 A	14-11-1995
		AT 151112 T	15-04-1997
		AU 656315 B2	02-02-1995
		AU 7244491 A	24-07-1991
		CA 2071213 A1	23-06-1991
		DE 69030386 D1	07-05-1997
		DE 69030386 T2	09-10-1997
		DK 506889 T3	22-09-1997
		EP 0506889 A1	07-10-1992
		ES 2100945 T3	01-07-1997
		GR 3023862 T3	30-09-1997
		JP 2968585 B2	25-10-1999
		JP 5505105 T	05-08-1993
		US 5407800 A	18-04-1995
		WO 9109944 A2	11-07-1991
		AT 169337 T	15-08-1998
